



TITLE:

Chemical and Biological Studies on
Photoinduced DNA Damage and Repair and
Subnucleosome Structures(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Hashiya, Fumitaka

CITATION:

Hashiya, Fumitaka. Chemical and Biological Studies on Photoinduced DNA Damage and Repair and Subnucleosome Structures. 京都大学, 2019, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21597>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2019-10-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博 士（理 学）	氏名	橋谷 文貴
論文題目	Chemical and Biological Studies on Photoinduced DNA Damage and Repair and Subnucleosome Structures (光照射に起因する DNA 損傷と修復、およびサブヌクレオソーム構造体に関するケミカルバイオロジー)		
(論文内容の要旨)			
<p>生体内の遺伝情報はDNAと呼ばれる化学物質に保持されている。また、DNAは化学反応の基質となり特に酸化損傷や光損傷を受けやすいことが知られており、DNAに保持される遺伝情報の管理は非常に重要である。DNAと結合し安定性を付与するタンパク質として、真核生物と古細菌におけるヒストンや、ミトコンドリアにおけるTFAMなどが知られている。</p> <p>本研究において申請者は、酸化損傷の原因となるDNA内電子移動を5-ブロモウラシル (^{Br}U)をプローブとして効率よく検知する手法を確立し、直鎖状DNA並びにゲノムDNAにおける電子移動を確認した。また同様の手法を用いてミトコンドリアのDNA結合タンパク質、TFAMからDNAへの電子移動を確認し、これによるチミンダイマーの修復を観察した。さらにヒストンとDNAの複合体について詳しく調べ、H3-H4オクタソームの構造と特性について検討した。以下で各章について概要を説明する。</p>			
1. 5-ブロモウラシルを含むDNAへの光照射によって生じたウラシルラジカルの生成部位特定			
<p>DNA内にはπ電子が豊富に存在しており、これを介した電子の移動が可能となっている。申請者らの研究室ではこの電子移動をチミンの類縁体である^{Br}Uを用いて検討してきた。電子移動が起こると^{Br}Uは還元されウラシルラジカルを生じる。先行研究において二本鎖DNA中の5' d-(G/C)A_{n = 1, 2, 3}^{Br}U^{Br}U-3' という配列に光照射を行うとGから^{Br}Uへの電子移動によりラジカルが生じることがわかっており、ホットスポット配列として報告されている。</p> <p>申請者は本研究においてウラシルラジカルからの生成物、ウラシルを酵素処理によって選択的に確認することで効率のいい電子移動の検出手法を確立した。この過程でホットスポット配列とは逆方向の配列5' d-^{Br}U^{Br}UA_{n = 1, 2, 3}(G/C)-3' でも同様の電子移動が起こることを確認し、逆ホットスポット配列として報告した。さらに、申請者は^{Br}Uが細胞中DNAにも導入可能であることを利用し、大腸菌ゲノムDNAにおける電子移動の検出を試みた。次世代シーケンサーによる分析、並びにピーク検索とモチーフ解析から5' d-C^{Br}U^{Br}UA^{Br}U(G/C)-3' という配列において効率的なウラシルの生成が示唆された。あらかじめ断片化したゲノムDNAやこの配列単体では効率的なウラシルの生成が見られず、ヌクレオソームを含むDNAではウラシルの生成が確認できたことから、本配列はゲノムDNAやヌクレオソームにおいて形成される負の超らせん構造依存的に光感受性が高まる特性を持つと予想された。</p>			

2. ミトコンドリア転写因子TFAMからDNAへの電子注入とチミンダイマー修復

DNAにおける電子移動は塩基間だけではなく、タンパク質の芳香族アミノ酸からも起こることが報告されている。本研究において申請者はミトコンドリア中に豊富に存在するDNA結合タンパク質、TFAMに着目し^{Br}Uを用いることでTFAMからDNAへの電子移動を検出した。実験にはTFAMとの高い親和性が報告されているDNA配列、Light strand promoter (LSP)とHeavy strand promoter (HSP)中の配列に^{Br}Uを挿入したものを用意し、光照射を行うとTFAMとの複合体中で有意にウラシルの生成が起こり、電子移動を確認することに成功した。またミトコンドリアとは関連のない長鎖DNAにおいてもTFAMの結合と電子移動が起こることがわかった。DNAへの電子移動は一般的な光損傷産物であるチミンダイマーの修復方法の1つとして知られており、本研究においてもTFAMからの電子移動によりチミンダイマーの修復が促進されることを確認した。結果として、ミトコンドリア中においてTFAMがチミンダイマーの修復を通じてミトコンドリアDNAの安定性に寄与している可能性が示唆された。

3. H3-H4オクタソームの特性と構造解析

真核生物のゲノムDNAはヒストンタンパクに巻き取られ保護されている。ヒストンタンパクはH2A, H2B, H3, H4の4つのバリエーションが知られており、2個のH2A-H2B二量体と1個のH3-H4四量体からなるヒストン八量体にDNAが巻き取られた複合体はヌクレオソームと呼ばれる。核内におけるヌクレオソームの形成において、まずH3-H4四量体がDNAと結合することでテトラソームを形成し、続いてH2A-H2Bが挿入されることがこれまでの研究で示唆されている。DNAとH3-H4テトラソームの複合体は複数存在し、テトラソームやオクタソームが報告されているが、オクタソームの詳細な構造と特性は不明であった。

本研究において申請者は分子動力学計算 (MD)により両複合体の構造を予測した。また、分離精製した両複合体をX線小角散乱とヌクレアーゼ処理によって分析し、その結果とMDから得られた予測構造と比較した。結果として、MDから得られた予測構造は実際の分析結果と矛盾せず、テトラソームやオクタソームの予測構造として有力なものであることがわかった。興味深いことに、オクタソーム形成によるヌクレオソームの形成への影響を確認すると、同条件におけるH2A-H2B二量体の取り込み効率はテトラソームよりもオクタソームの方が高いことがわかり、オクタソームが効率的なヌクレオソーム形成に関わっていることが示唆された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

DNAは酸化損傷や光損傷を受けやすいため、損傷部位を修復し、遺伝情報を保護する仕組みは生物が生存していく上で不可欠となっている。これまでにDNAと結合し安定性を付与するタンパク質や、損傷部位を見つけ出し修復を行うタンパク質が報告されている。

申請者はDNAの損傷と修復、およびそれらに関わるDNA結合タンパク質に関する研究を行った。まずチミンの類縁体である5-ブロモウラシル (^{Br}U) をプローブとしてDNAへと導入し、ホットスポット配列におけるDNA塩基間の電子移動の検出を試みた。この際、酵素処理によって ^{Br}U から生じたウラシルの生成部位を特定することで従来法よりも効率的な電子移動部位特定手法を確立した。本手法を用いることで直鎖状DNAとゲノムDNAにおいて新たな光感受性のホットスポット配列を発見した。

続いて申請者は上記の手法を利用することで、ミトコンドリアのDNA結合タンパク質、TFAMの芳香族アミノ酸残基からDNAへの電子移動について検討を行った。リコンビナントタンパクを用いた実験により、TFAMは配列非依存的にDNAと結合し、光照射によって電子注入を行えることが確認した。またこの電子注入によりDNAの光損傷産物であるチミンダイマーを修復できることを示した。

最後に申請者はヒストンH3-H4四量体とDNAの複合体であるテトラソームおよびオクタソームについて、その構造と特性を検討した。まず分子動力学計算 (MD) によって両複合体の構造を予測した。分離精製した複合体をX線小角散乱とヌクレアーゼ消化実験によって分析し、MDから得られた予測構造はこれらの実験結果と矛盾しなかったことから、本予測構造の妥当性を示した。またオクタソームはテトラソームよりも効率的にH2A-H2B二量体を取り込み、ヌクレオソームを形成できることを確認した。

以上、本論文で申請者は電子移動を伴う光照射によるDNAの損傷と修復について ^{Br}U をプローブとして利用する方法を開発した。この際、酵素反応を利用することで効率的な電子移動部位検出手法を確立し、DNAの塩基間およびTFAMからの電子移動を見出した。またH3-H4四量体とDNAの複合体であるテトラソームとオクタソームについて構造予測と特性の確認を行った。特にオクタソームの詳細な構造と特性を初めて明らかにした。一連の研究ではDNAの安定性とそれに関与するタンパク質を分子レベルで詳しく調べ、細胞内におけるDNAとDNA結合タンパク質の挙動について新たな知見を得たものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認められ、平成31年1月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降